Einige Eigenschaften der Membrantrinukleotidase von Halobakterien

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Gertrud Ginsbach

—

Saarbrücken

1970

Druck:
Universitätsbibliothek Saarbrücken

Aus dem II. Physiologischen Institut
der Universität des Saarlandes

Direktor: Prof.Dr.rer.nat. H. PASSOW

EINIGE EIGENSCHAFTEN DER MEMBRAN-TRINUKLEOTIDASE VON HALOBAKTERIEN

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

der Universität des Saarlandes

1970

vorgelegt von

Gertrud Ginsbach

Dekan: Prof.Dr.med. G. DHOM

Referent: Prof.Dr.rer.nat. H. PASSOW

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 15. Oktober 1970 abgelegt.

Meinen Eltern und

meinem Bruder

E I N L E I T U N G

Eine der wichtigsten neueren Entdeckungen auf dem Gebiet der Permeabilitätsforschung bestand in der Beobachtung, dass eine an die Zellmembran gebundene ATPase am aktiven Transport der Kationen beteiligt ist. Dieses Ferment spaltet ATP in ADP und anorganisches Phosphat und bedarf zu seiner Aktivierung neben Magnesium der gleichzeitigen Gegenwart von Kalium und Natrium. Besonders charakteristisch ist, dass das Ferment durch Herzglykoside gehemmt werden kann. Gegenwärtig beschäftigt man sich in zahlreichen Laboratorien mit der Aufklärung des Wirkungsmechanismus dieser 'Transport-ATPase'. Man weiss, dass es sich bei dieser Transport-ATPase um ein ausserordentlich komplexes biochemisches System handelt, bei dem zahlreiche Teilprozesse am aktiven Transport mitwirken. Besonderes Interesse gilt der Frage, ob es gelingt, die einzelnen an den verschiedenen postulierten Teilschritten beteiligten Fermente zu isolieren. Unglücklicherweise haben bisher alle Massnahmen, die zur Solubilisierung von Zellmembranen angewandt wurden, dazu geführt, dass die Fermentaktivität verloren geht. Dabei ist bis heute offen geblieben, ob es sich einfach um eine Denaturierung handelt, die unter dem Einfluss der verwendeten Detergentien hervorgerufen wurde, oder um eine Erscheinung von physiologischem Interesse. Es wäre denkbar, dass prinzipiell jede Veränderung der räumlichen Anordnung der verschiedenen am Transport beteiligten Fermente zur Hemmung von ATP-Spaltung und Kationentransport führen muss. Mit anderen Worten, man könnte

vermuten, dass jede Änderung der intermolekularen Abstände in der Membran zu Inaktivierung führt.

Angesichts dieser Sachlage schien es erfolgversprechend zu sein, die ATPase-Aktivität eines Membranpräparates aus Halobacterium halobium bzw. Halobacterium salinarium zu untersuchen. Von den Membranen dieser Mikroorganismen weiss man nämlich, dass sie sich in Lösungen niedrigen Kochsalzgehaltes spontan auflösen. Dieser Auflösungsprozess führt soweit, (1), dass einzelne Lipoproteidmoleküle entstehen, die sich in der Ultrazentrifuge trennen lassen. Da die Auflösung dieser Membranen ohne Zusatz irgendwelcher, die Löslichkeit der Strukturproteine der Membran fördernden Agenzien vonstatten geht, scheint hier ein Objekt vorzuliegen, mit dessen Hilfe vielleicht die Frage geklärt werden könnte, ob es sich beim Aktivitätsverlust der Membran-ATPase um einen durch Detergentien hervorgerufenen Denaturierungsprozess handelt, oder um einen Effekt, der einfach auf einer Separierung zusammengehöriger Membrankomponenten beruht.

Die Halobakterien sind imstande, erstaunliche Konzentrationsgradienten zwischen Zellinnerem und Nährmedium aufrechtzuerhalten. Die Kaliumkonzentration im Zellinneren beträgt etwa 4 M/l, die des Nährmediums etwa 25 mM/l. Das Konzentrationsverhältnis $K_{innen} : K_{aussen}$ beträgt also rund 1 : 160 (2). Eigene Versuche und weitere unveröffentlichte von DE und PASSOW (1967) haben gezeigt, dass trotz dieses grossen Konzentrationsgefälles die Membran für ^{42}K relativ

leicht durchlässig ist (3). Die dauernde Aufrechterhaltung eines Konzentrationsgefälles bei gleichzeitiger Durchlässigkeit einer Membran deutet auf die Beteiligung von aktivem Transport hin. DE und PASSOW (1966) wiesen die Existenz einer Membran ATPase in den Halobakterien nach. Im Gegensatz zu der tierischen ATPase handelt es sich hier allerdings um ein Ferment, das nicht nur ATP, sondern, mit praktisch gleicher Geschwindigkeit ITP, GTP und UTP spaltet. Es handelt sich also nicht um eine spezifische Membran-ATPase, sondern um eine Trinukleotidase. Das Ferment bedarf zu seiner Aktivierung neben dem Magnesium das Natrium. Man kann mehr als 9o % des Na durch K ohne Aktivitätseinbusse ersetzen. (Unter unseren Versuchsbedingungen wird immer zusammen mit dem Fermentpräparat eine kleine Menge an Na in die Suspensionen eingeschleppt, so dass wir nicht wissen, ob man das Na loo %ig durch K ersetzen kann.) Das Ferment lässt sich überdies nicht durch Herzglykoside hemmen. Es unterscheidet sich daher in Bezug auf die Aktivierbarkeit durch die Alkalimetallionen und Hemmbarkeit durch die Herzglykoside erheblich von der tierischen Transport-ATPase.

Bei ihren Versuchen hatten DE und Mitarbeiter gefunden, dass die Reaktivierbarkeit der Membrantrinukleotidase durch Natriumionen irreversibel verschwindet, wenn die Membranen vollständig dissoziiert werden. In der vorliegenden Arbeit sollte dieses Problem erneut aufgegriffen werden. Dabei sollte zunächst festgestellt werden, welchen Einfluss

die Magnesium und ATP Konzentration auf die ATP Spaltung durch das Ferment hat, um so die optimalen Bedingungen für erneute Experimente über den Einfluss von Natrium auf die Aktivierbarkeit der dissoziierten Membrantrinukleotidase zu ermitteln.

Zunächst wurden zwei Versuchsreihen mit undissoziierten Membranen in vier molarer Kochsalzlösung ausgeführt. Sie dienten der Bestimmung der optimalen ATP-und Magnesiumkonzentrationen des Mediums. Anschliessend wurde eine dritte Versuchsreihe durchgeführt, bei der die Membranen zuerst in Lösungen absteigender Kochsalzkonzentrationen dissoziiert wurden. Zur angenäherten Bestimmung des Dissoziationsgrades der Membran in Lösungen niedriger Kochsalzkonzentration wurde der zeitliche Verlauf der Änderung der Lichtextinktion gemessen. Die Lichtextinktion ist ein angenähertes Mass für den Dissoziationszustand der Zellmembranen. Abb. 13 zeigt den zeitlichen Verlauf der Änderungen der Lichtextinktion bei einer Reihe von Kochsalzkonzentrationen im Medium. Man erkennt, dass bei Kochsalzkonzentrationen unter etwa 2 M/l eine weitere Verminderung der Kochsalzkonzentration zu einer zunehmenden Lichtdurchlässigkeit der Membransuspensionen führt. Eingehende Untersuchungen von BROWN u.a. (4,5,6) haben ergeben, dass der Dissoziationsprozess unabhängig vom osmotischen Druck des Mediums erfolgt und weitgehend eine Funktion der Natriumkonzentration ist. Andere Ionenspezies können das Natrium nur unvollkommen vertreten.

Aus elektronenoptischen Aufnahmen von STOECKENIUS geht hervor, dass die Änderung der Lichtextinktion nicht ohne weiteres mit streng definierten Änderungen der Membranstruktur korrelliert werden kann (Abb. 13). Man erkennt im elektronenmikroskopischen Bild lediglich, dass bei einer Verminderung der Salzkonzentration der Suspensionslösungen die Konturen der Membran sich auflockern und dass schliesslich kleinere Bruchstücke entstehen, die aber immer noch aus einer Vielzahl von Molekülen zusammengesetzt sein können. Erst bei extrem niedrigen Kochsalzkonzentrationen kann man damit rechnen, dass einzelne Lipoproteidmoleküle in der Lösung vorhanden sind (1,5). Änderungen der Lichtextinktion stellen daher nur ein qualitatives aber sehr bequemes Mass für die Auflockerung der Membranstruktur bei abnehmender Ionenkonzentration des Mediums dar.

Dabei haben wir Membransuspensionen, die durch mechanisches Zerkleinern der Zellen in nahezu gesättigter Kochsalzlösung erhalten worden waren für etwa 1o min bei 25°C in Lösungen absteigender NaCl Konzentration inkubiert, bis der Dissoziationsprozess den für diejeweilige NaCl-Konzentration charakteristischen Endzustand erreicht hatte. Anschliessend wurde den Proben soviel festes NaCl hinzugefügt, bis in allen Ansätzen die gleiche Kochsalzkonzentration wieder erreicht war und dann die ATPase-Aktivität bestimmt. In allen diesen Ansätzen waren Magnesium und ATP in einer Konzentration vorhanden, mit der in Suspensionen undissoziierter Membranen maximale Aktivität erzielt wurde. Die Versuche ergaben,

dass unter diesen Bedingungen die ATPase Aktivität auch in Lösungen dissoziierter Membranlipoproteide voll erhalten bleibt oder sogar gesteigert wird.

MATERIAL UND METHODEN

Eigenschaften der halophilen Bakterien

Obwohl man NaCl in hohen Konzentrationen zur Konservierung von Fleisch und Fisch benutzt, gibt es Mikroorganismen, die sich selbst in gesättigten Salzlösungen ernähren und vermehren können. Hierzu gehören die halophilen Bakterien. Man kann sie unterteilen in obligat Halophile (z.B. Halobakterien) und fakultativ Halophile (z.B. Streptokokken). Unter den obligat Halophilen gibt es schwach (2 - 5 % NaCl), mittelmässig (5 - 2o %) und extrem (2o - 3o % NaCl) Halophile. Zu den letzteren gehören die beiden Stämme Halobacterium halobium und Halobacterium salinarium.

Halobakterien konnten aus stark salzhaltigen Seen, z.B. aus kalifornischen Salzseen oder dem Toden Meer und aus den Solen der Salinen Schoeningen und Braunschweig isoliert werden. Auch Salz, das durch Evaporation des Meerwassers gewonnen wird enthält halophile Bakterien, Steinsalz dagegen nicht. Auf gesalzenem Fisch können sie sich sehr gut vermehren, entfärben oder verfärben ihn und bewirken Verwesung des Proteins. So gelang es KLEBAHN (7) sie auf Klippfischen nachzuweisen. Er nannte die von ihm gefundenen Spezies 'Bazillus Halobium Ruber'. Heute weiss man, dass diese Mikroorganismen zur Familie der Pseudomonadaceen gehören. Es sind gramlabile Stäbchen, mit subpolarer Geissel (lophotrisch) und neigen zur Polymorphie (bilden keine Sporen). Sie wachsen auf festen Substraten in rot gefärbten Kolonien. Die von

KLEBAHN gewählte Bezeichnung 'Bazillus' ist also falsch und wurde daher von PETTER (8) in 'Bakterien' geändert.

Die Membranen von Salinarien und Halobien unterscheiden sich durch ihre Färbung und ihre Struktur. Die Membranen von Halobacterium halobium haben einen Stich ins Violette, während die der Salinarien hellrot sind. Ihre rote Färbung erhalten die Bakterienmembranen durch ihren Gehalt an Carotinoiden, von denen eines als Bakterioruberin α bezeichnet wird. Wird dieses in Alkohol oder Aceton aus den Membranen extrahiert, so findet man ein Absorptionsmaximum bei 492 mμ sowie ein kleineres bei 53o mμ (Abb. 12). LARSEN (9) beschreibt, dass die rote Pigmentierung in Zusammenhang mit dem hohen Salzbedarf steht. Die roten Halophilen benötigen den höchsten Salzgehalt von allen salzliebenden Bakterien.

Die Halobakterien nehmen bei verschiedenen NaCl Konzentrationen verschiedene Formen an; in nahezu gesättigter NaCl-Lösung (2o - 3o %) sind sie steife Stäbchen, bei niedrigen nehmen sie verschiedenartige Formen an; in 5 - 1o % NaCl werden sie kokkoid und bei noch geringeren Konzentrationen desintegrieren sie. Gestalt und Wachstum der Stäbchen werden sehr stark durch die Magnesiumkonzentration des Mediums beeinflusst. Diese Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration findet bei anderen Bakterienarten keine Parallele.

Die Halobakterien zeigen eine gewisse Anpassungsfähigkeit an die Salzzusammensetzung ihres Nährmediums. So war VOLCANI (9) imstande, Stämme von Halobacterium halobium aus dem Toten Meer zu isolieren, die einen Bedarf von 14 % NaCl und 7 %

Magnesiumsulfat besitzen. Diese Bakterien nutzen also Magnesium statt des fehlenden NaCl. Allerdings fand WEBER (1o), dass nur in einem kleinen Bereich Magnesium gegen NaCl ausgetauscht werden kann. Er erbrachte den Beweis, dass Magnesium unentbehrlich für das Wachstum der rot gefärbten Halophilen ist.

Bei manchen halophilen Bakterien ist es möglich, Kochsalz durch KCl zu ersetzen. So konnte GOLIKOVA (11) nachweisen, dass sporenbildende Bakterien, die optimal 15 - 18 % NaCl benötigen, KCl statt NaCl benutzen können. Ebenso konnte CHRISTIAN (12) zeigen, dass Bacterium halodenitrifitrans zumindest teilweise KCl durch NaCl ersetzen kann. Er glaubt, dass das auch für Halobacterium gilt. Überdies konnte LARSEN (9) zeigen, dass man das NaCl zumindest teilweise durch Magnesium im Nährmedium ersetzen kann.

Die Stoffwechselvorgänge der obligat Halophilen, soweit sie durch Messung der Atmungsaktivität erfasst werden können, verlaufen deutlich langsamer als bei anderen Bakterien. Sie sind obligat aerob. Sie werden deswegen auf der Schüttelmaschine gezüchtet, die eine gleichmässige Belüftung des Nährmediums bewirkt.

ZÜCHTUNG DER BAKTERIEN

Die Bakterien wurden in dem von uns modifizierten Nährmedium nach MOHR und LARSEN (5) gezüchtet: NaCl 25 %, $MgSO_4$ 7 %, $CaCl_2$ o.2 %, TRIS o.2 %, KCl o.16 %, KH_2PO_4 o.o2%, NaCitrat o.15 %. Als Stickstoffquelle wurde für die Halobien 2 % iges Oxoidpepton für die Salinarien 2 % iges Trypton mit 1o % igem Hefeautolysat und o.1o % Succinat hinzugefügt. Je 1 l Medium wird in einem 5 l Erlenmeyer 15 min bei 12o°C und 1.5 - 2 atü im Autoklaven sterilisiert.

Herstellung des Hefeautolysates: 5oo g Bäckerhefe werden in 5oo ml Leitungswasser suspendiert, für 24 Stunden bei 45 - 5o°C im Brutschrank bebrütet, danach für 1/4 h zum Kochen gebracht, abgekühlt, zentrifugiert und der Überstand mit 1 molarer TRIS-Lösung auf pH 7.4 eingestellt.

Zur Beimpfung des flüssigen Kulturmediums wurden auf Schräg-Agar gezüchtete Zellen verwendet, wobei der 2.5 % ige Agar-Agar dem oben beschriebenen Medium zugesetzt worden war. Die festen Kulturen wurden 8 - 1o Tage bei 3o° bebrütet und dann auf das flüssige Medium überimpft, wobei ungefähr 2 oder 3 Schrägen zur Inokulation von 1 l benötigt wurden. Die flüssigen Kulturen wurden 5 - 8 Tage auf der Schüttel-maschine bei 3o°C inkubiert und anschliessend, sofern mit dem Versuch nicht gleich begonnen wurde, im Kühlraum aufbewahrt.

FERMENTPRÄPARATION

Die Bakterien wurden bei 4°C für 15 min. bei 8ooo g zentrifugiert, der Bodensatz wurde je nach den gewünschten Versuchsbedingungen in 2.5 oder 4 Mol/l NaCl resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Anschliessend wurden die Bakterien im Glasperlenhomogenisator der Firma B. BRAUN, Melsungen zerschlagen. Die Glasflaschen des Homogenisators wurden zu 1/3 mit Glasperlen und zu einem weiteren Drittel mit Bakterien gefüllt, verschlossen und dreimal für 1 min. unter Kühlung mit Kohlensäureschnee im Homogenisator geschüttelt. Zur Trennung der Glasperlen von den Bakterienmembranen wurde das Gemisch aus Glasperlen und zerschlagenen Bakterien mit 2.5 bzw. 4 molarer NaCl-Lösung verdünnt, aufgeschüttelt, und bei 8oo Upm etwa 3 - 4 min. zentrifugiert. Das Sediment wurde mehrmals resuspendiert und zentrifugiert. Die überstehenden Lösungen wurden miteinander vereinigt. Nunmehr erfolgte 3 - 4 maliges Waschen der stark verdünnten Suspensionen fragmentierter Zellen bei 34 5oo g für 15 min. Der Überstand wurde verworfen und die oberste leicht durch Schütteln oder Blasen mit einer Pipette abzulösende Schicht des Sedimentes in NaCl resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Die untersten Schichten des Bodensatzes wurden verworfen, da wir vermuten, dass es sich hier um noch unzerschlagene Bakterienleiber handelt. Die Membranen, die aus den in 4 l Nährmedium gezüchteten Zellen gewonnen wurden, wurden schliesslich in ca. 5 - 8 ml NaCl-Lösung aufgenommen. Sodann wurde die Extinktion von o.o2 ml Membransuspension in 2.48 ml NaCl-Lösung bei 8oo m/u gemessen, um ein Mass für deren Konzentration zu erhalten.

Ausserdem wurde nach Extraktion mit Äthanol der Carotingehalt bestimmt, von dem man vermuten darf, dass er der Membranmasse proportional ist.

MESSUNG DER TRINUKLEOTIDASEAKTIVITÄT

Die Trinukleotidaseaktivität wurde mit Hilfe von ATP als Substrat bestimmt. Die Membranen wurden zusammen mit den gewünschten Konzentrationen an ATP, aktivierenden Ionen (Mg^{++}, Na^{+}) und TRIS Puffer (pH 7.4) für 45 - 6o min. bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurde nach Zusatz eines Tropfens Serumalbuminlösung die Reaktion im Eisbad durch Zupipettieren von Trichloressigsäure (TCE) gestoppt und im Überstand das freigesetzte anorganische Phosphat nach der Methode von FISKE und SUBBAROW (3) bestimmt. Der Bodensatz wurde anschliessend mit Äthanol extrahiert und der Carotingehalt durch Messung der Lichtextinktion bei 492 m/u ermittelt. In einer Reihe von Versuchen wurden aliquote Teile der Reaktionslösung vor Fällung mit TCE entnommen, mit einem Überschuss an Äthanol versetzt und zentrifugiert. Die Carotinbestimmung erfolgte dann im dekantierten Überstand. Durch Licht wird das Carotin gebleicht. Dieser Prozess wird durch TCE begünstigt.

Bei den Versuchen über den Einfluss der Na-Konzentration auf die Aktivität mehr oder weniger stark dissoziierter Membranen, wurden die Membranen für 1o min. bei 25°C in einer Lösung geeigneter NaCl-Konzentration inkubiert und damit ein mehr oder weniger grosses Ausmass an Dissoziation erreicht. Nach Messung der Lichtextinktion bei 8oo m/u wurde soviel

festes NaCl zu den Ansätzen hinzugefügt, dass die NaCl-Endkonzentration überall auf denselben Wert eingestellt wurde (in der Regel 2.74 oder 4.o Mol/l).

Da die Fermentpräparation neben dem Eiweiss und Lipid der Plasmamembran auch noch eine unbekannte Menge an stickstoffhaltigen Kohlehydraten im Zellwall enthält, ist die Bestimmung der spezifischen Fermentaktivität in Umsatz/mg Protein nicht ohne weiteres möglich. Wir haben daher, da es uns nur auf Relativmessungen ankam, lediglich Ansätze aus dem gleichen Fermentpräparat miteinander verglichen oder die Aktivität auf den Carotingehalt bezogen.

E R G E B N I S S E

Magnesium als Aktivator

a) bei Halobakterium salinarium

b) bei Halobakterium halobium

Viele Enzyme brauchen für ihre Aktivität bestimmte zweiwertige Ionen, unter denen Magnesium eine bedeutende Rolle spielt. Bei den Kinasen, den Phosphat übertragenden Enzymen z.B. sind Magnesiumionen möglicherweise an der Bindung des Substrates an das Enzym beteiligt. Bei der ATP-Spaltung durch Membranpräparationen von Halobakterium salinarium erreicht die Fermentaktivität mit zunehmender Magnesiumkonzentration ein Maximum bzw. ein Plateau. Die Lage des Maximums hängt ab von der Natriumkonzentration des Suspensionsmediums. Beträgt die Na^+-Konzentration 2.5 Mol/l, so liegt es bei etwa 5 mMol/l (Abb. 2). In 4 Mol/l NaCl bildet sich kein Maximum mehr aus. Oberhalb von ca. 5o mMol/l Mg^{++} wird ein Plateau erreicht (Abb. 1). Die meisten der später beschriebenen Versuche wurden bei einer maximalen Mg^{++}-Konzentration von etwa loo mMol/l ausgeführt. Bei Halobakterium halobium findet man in 4 Mol/l NaCl ein ausgesprochenes Maximum der Aktivität, bei etwa 5o mMol/l Magnesiumsulfat. Es wird kein Plateau erreicht. (Abb. 3).

REAKTIVIERUNG DER FERMENTAKTIVITÄT DISSOZIIERTER MEMBRANEN

Membransuspensionen wurden in o.8 Mol/l NaCl-Lösung für 1o min. bei 25°C inkubiert. Es kommt dabei zu der in der Einleitung beschriebenen Dissoziation. Danach wird soviel festes NaCl hinzugefügt, dass eine Endkonzentration von 2.74 Mol/l NaCl im Suspensionsmedium erreicht wird, und die Wirkung steigender Magnesiumkonzentrationen überprüft. Die Aktivität des Fermentes steigt hierbei bis zu einer Konzentration von 3 mMol/l Magnesium relativ steil an, wächst dann mit verminderter Neigung weiterhin linear an, ohne ein Plateau zu erreichen (Abb. 4). Bei entsprechenden Versuchen in Gegenwart von 4 Mol/l NaCl wird bei einer Magnesiumkonzentration 5o mMol/l maximale ATP-Spaltung erreicht, die bis zu einer Magnesiumkonzentration von etwa 1oo mMol/l unverändert bleibt (Abb. 5). Offensichtlich besteht eine Wechselwirkung zwischen Magnesium und Natrium bei der Aktivierung des Fermentes.

ENZYMAKTIVITÄT ALS FUNKTION DER SUBSTRATKONZENTRATION

Die Aktivität des Enzyms wurde in Gegenwart von 4 Mol/l NaCl/1oo mMol/l Magnesium und steigenden ATP-Konzentrationen gemessen. Maximal wurde eine ATP-Konzentration von 5 mMol/l verwendet. Das pH lag zwischen 7.2 - 7.4, die Inkubationszeit betrug 45 - 6o min. Temperatur 37°C.
Die Kurven zeigen die von MICHAELIS-MENTEN beschriebene Sättigungskinetik. Bei der Auftragung nach LINEWEAVER-BURK findet man ein K_m von ca. o.5 µMol/l (Abb. 6). Eine Angabe

über die spezifische Aktivität des Enzyms in µMol Substrat/ min . mg Protein kann anhand der vorliegenden Daten nicht gemacht werden (s. methodischer Teil).

REAKTIVIERUNG DER ENZYMAKTIVITÄT DISSOZIIERTER MEMBRANEN DURCH NaCl

Mit fallender NaCl-Konzentration im Medium dissoziieren die Membranen in zunehmendem Masse. Damit taucht die Frage auf, ob dieser Dissoziationsprozess mit einer Änderung der Fermentaktivität verbunden ist. Änderungen der Fermentaktivität lassen sich aber nur dann ermitteln, wenn die Konzentration der aktivierenden Na-Ionen konstant gehalten wird. Zu diesem Zweck wurden Membranen in Medien absteigender NaCl-Konzentration für 10 min. bei 0.5°C präinkubiert. Anschliessend wurde jedem Ansatz genug festes NaCl hinzugefügt, um überall dieselbe Endkonzentration im Medium zu erreichen. Dabei wurden Experimente mit 3 verschiedenen Endkonzentrationen ausgeführt, nämlich 2.74 und 4.1% Mol/l NaCl. Das zur Aktivierung neben dem Na^+ notwendige Mg^{++} wurde in der Regel erst nach dem Ende der Präinkubationsperiode hinzugesetzt. In einigen Experimenten war das Mg^{++} bereits während der Präinkubationsperiode im Medium vorhanden. Bei hoher Magnesiumkonzentration können die Membranen nicht in demselben Ausmass dissoziieren wie bei geringerer. Diese Versuche sind daher geeignet nachzuweisen, dass es sich bei den durch Präinkubation mit niedrigen NaCl-Konzentrationen erzielten Effekten tatsächlich um Folgen der Dissoziation handelt.

Der nachträgliche Zusatz von NaCl zu vorher dissoziierten Membranen führt zu einer starken Reaktivierung des Enzyms. Dabei wird die Reaktivierung um so grösser, je geringer die NaCl-Konzentration während der Präinkubation war, d.h. also je stärker die Membranen dissoziiert waren (Abb. 5).
Die Aktivität des reaktivierten Enzyms fällt bei steigender NaCl-Konzentration des Präinkubationsmediums bis zu einem Minimum ab, das bei 2 Mol/l liegt, und steigt dann bis zu einer Konzentration von 4 Mol/l wieder an (Abb. 7). Die Reaktivierung des Fermentes durch nachträglichen Zusatz von NaCl wird begrenzt durch die Magnesiumkonzentration. Wird das $MgSO_4$ vor der Präinkubation hinzugegeben, kommt es zu einer geringeren Reaktivierung des Fermentes als bei Zusatz des Mg^{++} nach der Präinkubation, d.h. nach der Dissoziierung der Membranen (Abb. 7). Es konnte gezeigt werden, dass Magnesium stabilisierend auf die Membranen wirkt, also vor Dissoziation in Lösungen mit geringem Salzgehalt schützt. In diesem Falle würde das also heissen: Wenn Magnesium später zugesetzt wird, sind die Membranen stärker dissoziiert als bei gleichzeitigem Zusatz. Das würde bedeuten, dass man mit stärker dissoziierten Membranen durch nachträglichen Zusatz von NaCl und $MgSO_4$ eine stärkere Reaktivierung erreichen kann. Wie an dem vorher beschriebenen Versuch an H. halobium schon gezeigt wurde, ist der Anstieg der Aktivität bei in niedrigen Salz- und Magnesiumkonzentrationen inkubierten Suspensionen linear, und zwar bis zu 1oo mMol/l $MgSO_4$. Ausserdem ist die Aktivität des Fermentes abhängig von der Konzentration des Mg^{++} im Medium. Abb. 9 und 1o zeigen, dass bei geringer Mg^{++}-Konzen-

tration ungefähr der gleiche Effekt erzielt wird wie bei anderen Versuchen, bei denen das Mg^{++} sofort zugesetzt wurde. Das Enzym kann hier kaum reaktiviert werden (Abb. 11).

D I S K U S S I O N

Das wichtigste Ergebnis der vorliegenden Arbeit besteht in der Beobachtung, dass die Aktivität der Trinukleotidase erheblich zunimmt, wenn man die Membranen von H. halobium und H. salinarium vor Bestimmung der Enzymaktivität dissoziieren lässt. Bei Erniedrigung der NaCl-Konzentration im Suspensionmedium nimmt die Lichtextinktion der Membransuspensionen ab. Ausserdem kann man durch elektronenmikroskopische Aufnahmen, (die freundlicherweise für uns von Prof. W. STOECKENIUS, San Francisco, gemacht wurden), sowie durch Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge nachweisen, dass sich die Membranen mit abnehmender Ionenkonzentration zunächst auflockern, dass ihre Konturen unscharf werden und dass sie schliesslich bei sehr niedrigen Ionenstärken vollständig dissoziieren. Gleichzeitig erfolgt eine Abnahme der Aktivität der Membrantrinukleotidase. Diese Abnahme der Trinukleotidaseaktivität ist aber ausschliesslich auf eine Verminderung der Konzentration der aktivierenden Na-Ionen im Medium zurückzuführen. Fügt man nämlich dem Suspensionsmedium nach Abschluss des Dissoziationsprozesses genügend Kochsalz zu, um in allen Ansätzen eine etwa 4 molare Kochsalzkonzentration zu erzielen, so findet man, dass die Aktivität des Fermentes umso grösser ist, je stärker die Membranen ursprünglich dissoziiert waren. Dieses Ergebnis steht in einem gewissen Gegensatz zu Befunden mit anderen Enzymen aus halophilen Bakterien. So haben BAXTER und GIBBONS (1959), (13) nachweisen können, dass Glycerol- und Lactatdehydrogenase von Halobacterium sal.

nur bei hohen Salzkonzentrationen aktiv sind und bei niedrigen NaCl-Konzentrationen irreversibel inaktiviert werden. Die Na-Ionen sind also bei der Membrantrinukleotidase nicht nur notwendig um eine Denaturierung des Proteins zu verhindern, sondern sie wirken ausserdem noch als Aktivatoren des Fermentes.

Die Ursachen für die Aktivitätssteigerung bei der Dissoziation der Membrantrinukleotidase sind uns unbekannt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Membransuspensionen zeigen, dass bei hohen Kochsalzkonzentrationen die Zellmembranen sich zu Bläschen zusammenfügen, wobei häufig zahlreiche Bläschen ineinandergeschachtelt sind. Mit anderen Worten, ein grosses Bläschen kann ein kleineres umschliessen, in dessen Innerem sich ein noch kleineres befinden kann. Die Membranstruktur lockert sich nun bei abnehmender Kochsalzkonzentration des Mediums auf; insbesondere verschwinden die ausgesprochenen Bläschenstrukturen und die Membranen können sich dann, soweit man das in dem stark aufgelockerten Zustand noch beurteilen kann in Schichten aneinander lagern. Man kann daher den Verdacht haben, dass bei den undissoziierten Membranen, die niemals mit Lösungen geringer Salzkonzentration in Kontakt gekommen waren, nicht die gesamte Membranoberfläche wirklich mit dem ATP in Kontakt kommt. Erst wenn diese Bläschenstruktur zerstört wird, könnte das gesamte Ferment wirklich mit dem ATP reagieren.

Unsere Versuche zeigen damit, dass die Membrantrinukleotidase von Halobacterium halobium und Halobacterium salinarium auch bei vollständiger Dissoziation der Membranstruktur ihre volle

Aktivität behält. Es müssen also alle Teilschritte, die mit der ATPase-Reaktion zusammenhängen in den kleinsten Einheiten, die beim Dissoziationsprozess entstehen, ablaufen können. Damit sollte sich ein Anhaltspunkt ergeben für eine spätere Isolierung und Reinigung der Membran-ATPase.

Es ist gegenwärtig noch unklar, wieweit die Membrantrinukleotidase am Zustandekommen des aktiven Transportes beteiligt ist. Bei der Bestimmung der Michaeliskonstanten haben wir einen Wert von etwa 5/uMol/l gefunden. Die Affinität des Enzyms zum Substrat ist damit etwa ebenso hoch, wie bei der tierischen Transport-ATPase. Dieser Befund bereitet uns erhebliche Schwierigkeiten. Wir haben versucht in den Bakterienzellen ATP zu bestimmen. Dabei wurden enzymatische Tests einerseits mit Glycerinaldehyddehydrogenase und Phosphorglycerokinase andererseits mit Feuerfliegenbeinen gemacht. Mit der ersten Methode konnten wir kein ATP nachweisen. Mit der zweiten ergab sich, dass der Maximalgehalt an ATP in den Zellen etwa o.1 mMol/l beträgt. Diese Konzentrationen liegen um eine Grössenordnung niedriger als in tierischen Zellen. Das Ferment könnte bei den Bakterien niemals mit ATP gesättigt sein. Das Transportsystem würde daher nur mit einem Bruchteil seiner maximalen Kapazität operieren können. Man möchte daher bezweifeln, dass die in dieser Arbeit näher charakterisierte Trinukleotidase tatsächlich am aktiven Transport durch die Membran der Halobakterien beteiligt ist.

Diese Zweifel werden weiterhin bestärkt, durch die Beobachtung, dass die Membrantrinukleotidase zu ihrer Aktivierung

nicht der gleichzeitigen Gegenwart von Kalium und Natrium bedarf, sondern, dass die Aktivierung durch Natrium allein möglich ist. Ebenso kann man ja bis zu 90 % des aktivierenden Natriums durch Kalium ersetzen, ohne dass man deshalb eine Aktivitätseinbusse beobachtet.

Obwohl es also gegenwärtig nur schwer vorstellbar ist, dass die hier beschriebene Membrantrinukleotidase eine Rolle im aktiven Kationentransport spielt, sollte man den Gedanken an eine derartige Beteiligung doch nicht ohne weiteres aufgeben. Um aktiven Transport bewerkstelligen zu können, braucht man in jedem Fall ein Ferment, das eine energiereiche Verbindung umsetzen kann. Die Membrantrinukleotidase ist zumindest im Prinzip hierzu fähig.

Anhaltspunkte für das Vorliegen anderer Energiequellen in den Halobakterien existieren gegenwärtig nicht, so dass es sinnvoll bleibt, weiter mit dem Gedanken zu operieren, dass die Membrantrinukleotidase am aktiven Transport beteiligt ist.

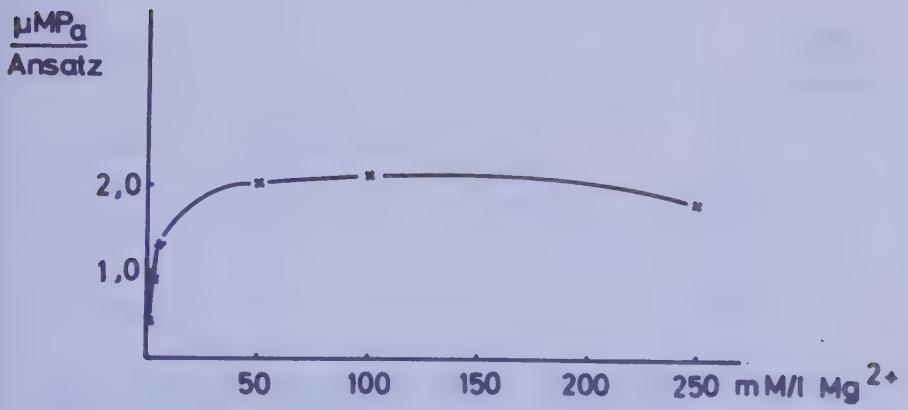

Abb. 1: Einfluss der Mg^{++}-Konzentration auf die ATP-Spaltung undissoziierter Membranen von H. salinarium

Zusammensetzung des Suspensionsmediums: ATP: 5 µMol/ml (bzw. 12.5 µMol/Ansatz; NaCl: 4. Mol/l; TRIS: 100 mMol/l; pH: 7.4; Temperatur: 37°C; Inkubationsdauer: 45 min; Maximale ATP-Spaltung: 27 % der zugesetzten Menge. Carotingehalt der Membransuspension: E_{492} - 0.232. Bei der Ernte waren die Bakterien 8 Tage alt. Abszisse: Mg^{++} in µMol/ml, Ordinate: µMol Phosphat/Ansatz

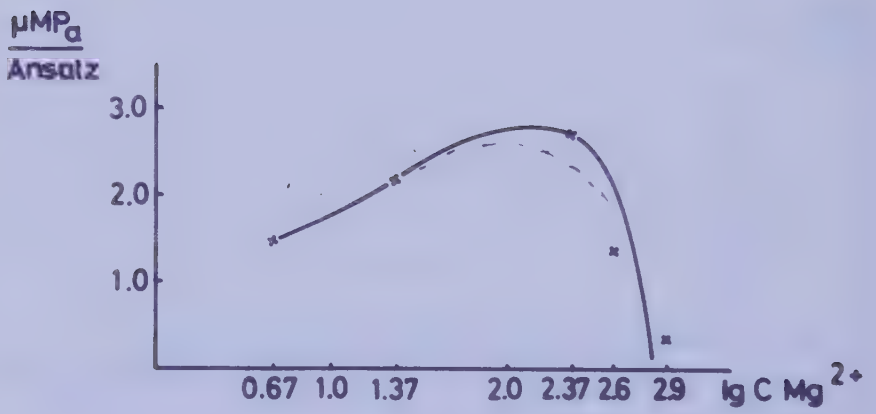

Abb. 2: Einfluss der Mg^{++}-Konzentrationen auf die ATP-Spaltung in undissoziierten Membranen von H. salinarium.

Zusammensetzung des Suspensionsmediums: ATP 5/uMol/ml (bzw. 12.5 /uMol/Ansatz); NaCl: 2.5 Mol/l; pH: 6.9; Temperatur 37°C; Inkubationsdauer: 45'; Maximale ATP-Spaltung: 34 %; E_{492} - o.269/Ansatz; Ferment vom Vortage. Abszisse: negativer Logarithmus der Mg^{++}-Konzentration. Ordinate: uMol Phosphat/ Ansatz.

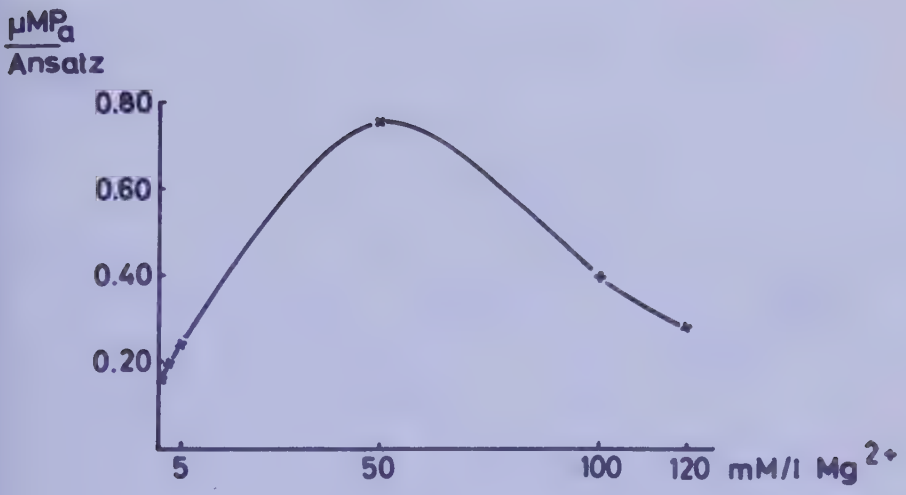

Abb. 3: Einfluss der Mg^{++}-Konzentration auf die ATP-Spaltung undissoziierter Membranen von H. halobium.

Zusammensetzung des Suspensionsmediums: ATP: 2 µMol/ml (bzw. 5 µMol/Ansatz); NaCl: 4 Mol/l; pH: 7.o; Temperatur: 37°C; Inkubationsdauer: 6o'; Maximale ATP-Spaltung: 34.5 % in 45 min Carotingehalt der Membransuspension: E_{492} - o.3o5/Ansatz. Vor der Ernte wurden die Bakterien 6 Tage bei 3o°C inkubiert, danach 5 Tage im Kühlraum gehalten. Abszisse: Mg^{++} in/uMol/ml Ordinate:/uMol Phosphat/Ansatz

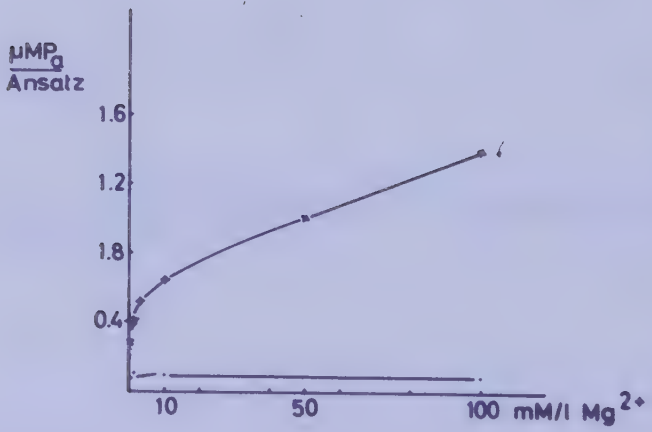
µMP
Ansatz
1.6
1.2
1.8
0.4
10
50
100 mM/l Mg 2+

Abb. 4: Einfluss steigender Mg^{++}-Konzentrationen auf die ATP-Spaltung von H. halobium-Membranen, die durch Inkubation bei 2 verschiedenen NaCl-Konzentrationen vor Versuchsbeginn in unterschiedlichem Ausmass dissoziiert wurden.

Zusammensetzung des Suspensionsmediums: ATP: 2 µMol/ml (bzw. 5 µMol/Ansatz;

NaCl: a) zur Präinkubation o.83 Mol/l,

b) komplementiert zur Inkubation 2.7 Mol/l; Mg^{++} : o.1. 1.5, 3., 1o, 5o, 1oo mMol/l;

$E_{Carotin}$ = o.272, 8; Die Bakterien waren 6 Tage alt, Ferment vom Vortag wurde nochmals zentrifugiert. Maximale Spaltung: 21 % für 45' Inkubationsdauer.

a) Vorinkubation 1o' bei 25°C,

b) Inkubation 6o' bei 37°C.

Ext. der dissoziierten Membranen bei 37°C.

Abszisse: Mg^{++} in µMol/ml, Ordinate: µMol Phosphat/Ansatz.

Mg^{++}	mit Kompl.	ohne Kompl.
o	1) o.476	
o.5	2) o.495	2b) o.39o
1.5	3) o.48o	3b) o.395
3.o	4) o.485	
1o	5) o.495	5b) o.46o
5o	6) o.57o	
1oo	7) o.61o	7b) o.55o

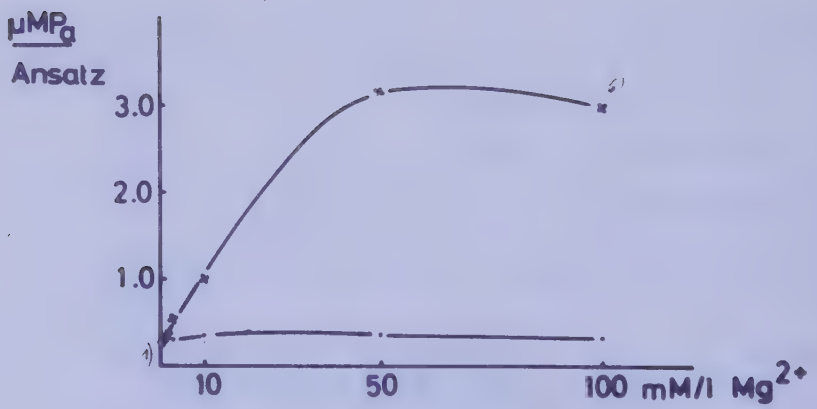
µMP$_a$
Ansatz
3.0
2.0
1.0
10
50
100 mM/l Mg^{2+}

Abb. 5: Einfluss steigender Mg^{++}-Konzentrationen auf die ATP-Spaltung von H. halobium Membranen, die durch Inkubation bei 2 verschiedenen NaCl-Konzentrationen vor Versuchsbeginn in unterschiedlichem Ausmass dissoziiert wurden.

Zusammensetzung des Suspensionsmediums:

ATP: 2 µMol/ml (bzw. 5 µMol/Ansatz;

NaCl: a) zur Präinkubation o.83 Mol/l,

b) komplementiert zur Inkubation 4.12 Mol/l;

Mg^{++} o.1, 1.o, 1.5, 3.o, 1o.o, 5o.o, 1oo mMol/l;

$E_{Carotin}$ = o.272, 8;

Die Bakterien waren 6 Tage alt. Ferment vom Vortage wurde nochmals zentrifugiert.

Maximale Spaltung: 47.7 %; E_{8oo} bei 37°C Ext. der dissoziierten Membranen bei 37°C.

Abszisse: Mg^{++}

Ordinate: µMol Phosphat/Ansatz

Mit Komplement	Ohne Komplement
1) o.46o	
2) o.42o	2a) o.295
3) o.49o	3a) o.3oo
4) o.5oo	
5) o.49o	5a) o.38o
6) o.52o	
7) o.51o	7a) o.32o

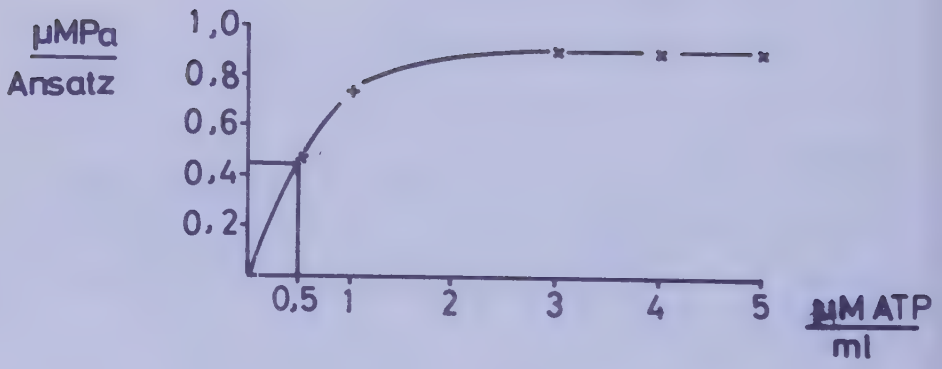

Abb. 6a: ATP-Spaltung in Membransuspensionen von H. salinarium als Funktion steigender ATP-Konzentrationen.

Ordinate: /uMol Phosphat/Ansatz - Reaktionsgeschwindigkeit;
Abszisse: ATP-Konzentration in /uMol.

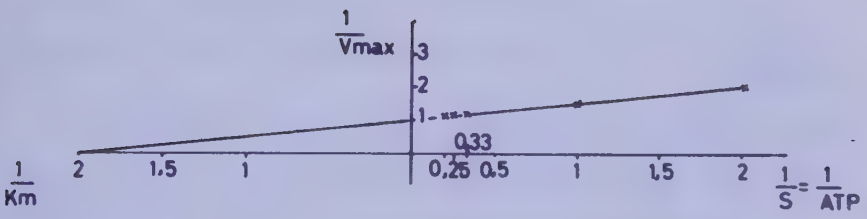

Abb. 6b: Darstellung der Ergebnisse aus Abb. 6a nach LENIWEAWER-BURK

Bakterien 8 Tage alt, Ferment vom Vortage; E_{492} : o.15o/ Ansatz; APT: variiert; pH: 6.9; Mg^{++} : 1oo mMol/l; NaCl: 4 Mol/l mit TRIS 1oo mMol/l, pH: 7.4. Maximale Reaktionsgeschwindigkeit: 5.4 % bei 45'; Inkubation 6o' bei 37°C; E_{8oo} in o.o2 ml Membransuspension/2.48 ml NaCl= o.32o. Ordinate: Kehrwerte der Reaktionsgeschwindigkeit. Abszisse: Kehrwerte der ATP-Konzentration

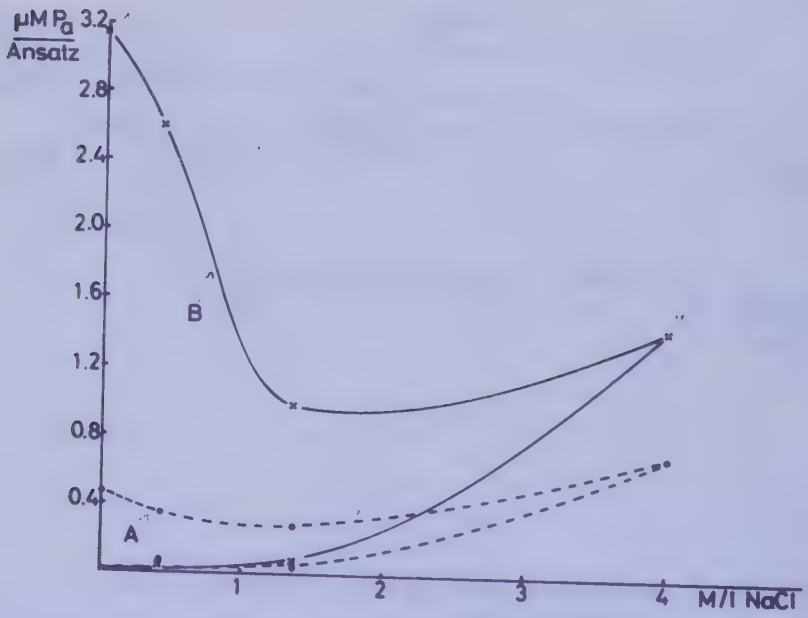
µM P_a / Ansatz
3.2
2.8
2.4
2.0
1.6
1.2
0.8
0.4
A
B
1
2
3
4
M/l NaCl

Abb. 7: H. halobium

1. Verminderung der Fermentaktivität durch Dissoziation der Membranen bei fallenden NaCl-Konzentrationen.
2. Reaktivierung des bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen präinkubierten Fermentes durch Zusatz von festem NaCl.

Nach Zusatz des NaCl betrug die Endkonzentration in allen Ansätzen 4.12 Mol/l NaCl (Kurven A und B)

----- Zugabe von 1oo mMol/l Mg^{++} vor Beginn der Präinkubation

_____ Zugabe des Mg^{++} nach 1o min. Präinkubation.

Endkonzentration im Medium in beiden Fällen 1oo mMol/l;

Alter der Bakterien: 8 Tage; $E_{Carotin}$: o.1oo bei 492 mμ;

ATP:/uMol/Ansatz; TRIS: 6o mMol/l; pH: 7.4;

Maximale Spaltung: 47.25 / in 45';

Präinkubation: 1o' bei 37°C; Test: 6o' bei 37°C.

Abszisse: NaCl-Konzentration im Präinkubationsmedium;

Ordinate: Fermentaktivität (/uMol Phosphat/Ansatz)

5 Tage altes Ferment.

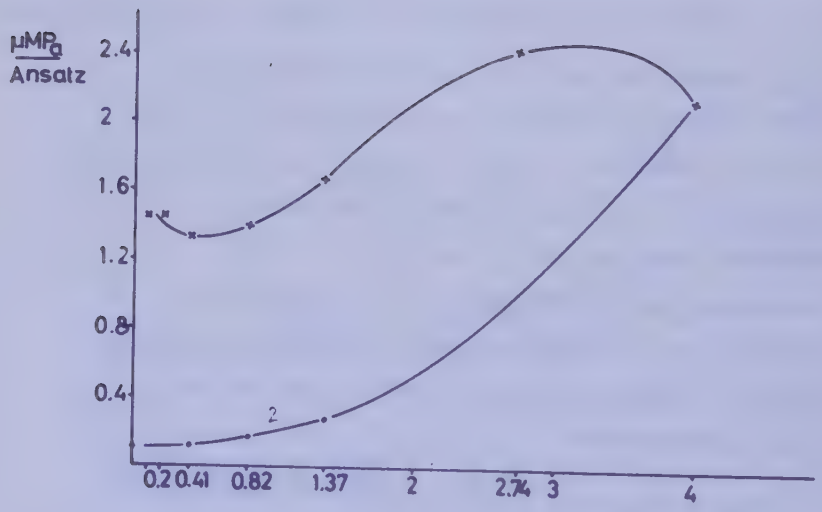
µMP
Ansatz
2.4
2
1.6
1.2
0.8
0.4
2
0.2
0.41
0.82
1.37
2
2.74
3
4

Abb. 8: 1. Verminderung der Fermentaktivität durch Dissoziation der Membranen bei fallenden NaCl-Konzentrationen.
2. Reaktivierung des bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen präinkubierten Fermentes durch Zusatz von festem NaCl.

Nach Zusatz des NaCl betrug die Endkonzentration in allen Ansätzen 4.12 Mol/l. Die Bakterien waren in einem Nährmedium gezüchtet worden, dem ein Aminosäuregemisch zugesetzt worden war. Im Präinkubationsmedium in allen Fällen 1oo mMol/l Mg^{++}. Das Ferment wurde aus Bakterien gewonnen, die 5 Tage alt waren. ATP: 5 µMol/Ansatz; TRIS: 6o µMol/l; pH: 7.4; Maximale Spaltung: 38 % in 45'; Präinkubation: 1o' bei 37°C; Test: 6o' bei 37°C.

Abszisse: NaCl-Konzentration im Präinkubationsmedium

Ordinate: Fermentaktivität (µMol Phosphat-Ansatz)

Mit Komplement		Ohne Komplement	
1)	1.1oo	1b)	o.44o
2)	1.ooo		
3)	1.ooo		
4)	o.96o	4b)	o.78o
5)	o.94o	5b)	o.75o
6)	o.92o	6b)	o.82o
7)	o.92o		
8)	o.88o		

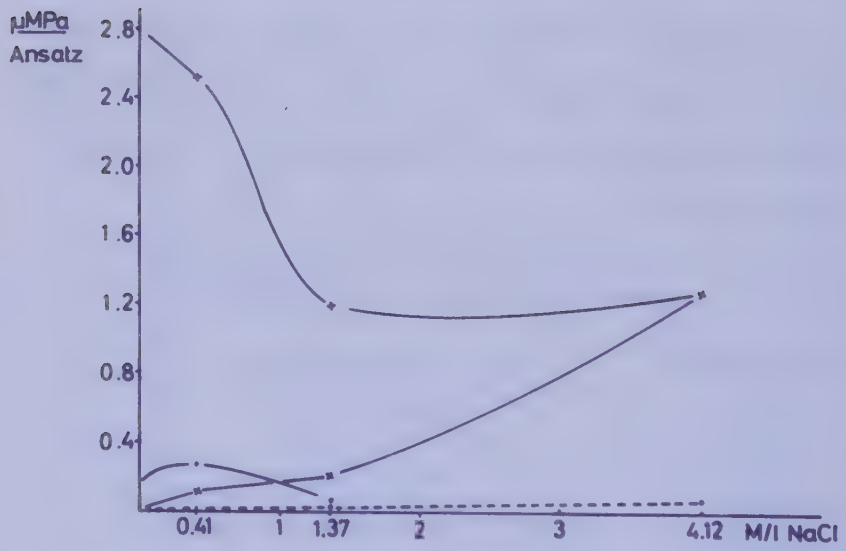
µMPa
Ansatz
2.8
2.4
2.0
1.6
1.2
0.8
0.4
0.41
1
1.37
2
3
4.12
M/l NaCl

Abb. 9: H. salinarium

1. Verminderung der Fermentaktivität durch Dissoziation der Membranen bei fallenden Endkonzentrationen.
2. Reaktivierung des bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen präinkubierten Fermentes durch Zusatz von festem NaCl.

Nach Zusatz des NaCl betrug die Endkonzentration in allen Ansätzen 4.12 Mol/l NaCl. Mg^{++} Konzentration: 5 /uMol/ml. Das Mg^{++} wurde nach Ablauf der Präinkubationsperiode zum Medium zugegeben; Ferment aus 5 Tage alten Bakterien; $E_{Carotin}$: o.15 bei 492 m/u; ATP: 5/uMol/Ansatz; TRIS: 6o/uMol/l; pH: 7.4. Präinkubation: 1o min bei 37°C; Maximale Spaltung: 42 % in 45 min; E_{7oo} bei 37°C.

Kurve I				Kurve II			
mit Komplement		ohne Komplement		mit Komplement		ohne Kompl.	
1)	o.315	1b)	o.28o	1)	o.3oo	1b)	o.29o
2)	o.35o	2b)	o.31o	2)	o.345	2b)	o.32o
3)	o.53o	3b)	o.5oo	3)	o.52o	3b)	o.5oo
4)	o.59o			4)	o.575		

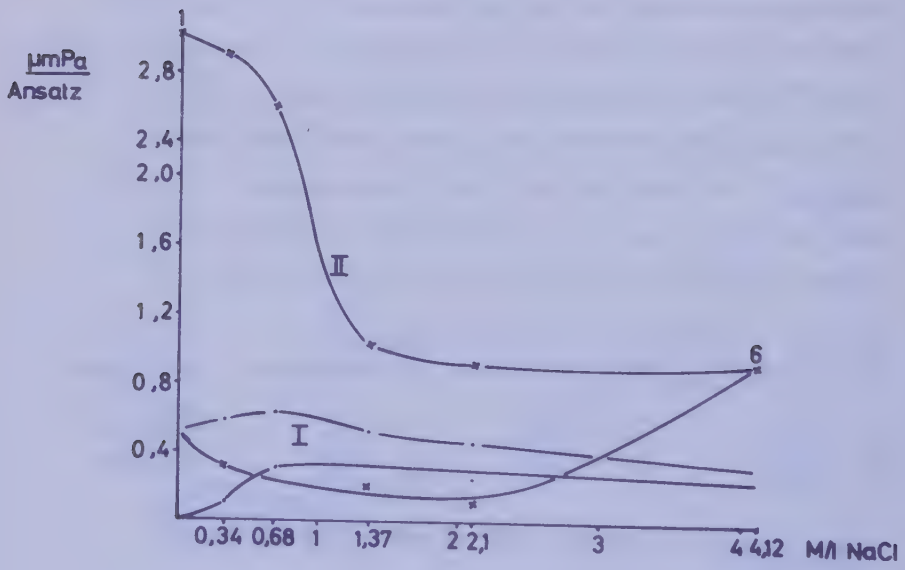
µmPa
Ansatz
1
2,8
2,4
2,0
1,6
1,2
0,8
0,4
II
I
6
0,34
0,68
1
1,37
2
2,1
3
4
4,12
M/l NaCl

Abb. 1o: H. halobium

1. Verminderung der Fermentaktivität durch Dissoziation der Membranen bei fallenden NaCl-Konzentrationen.
2. Reaktivierung des bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen präinkubierten Fermentes durch Zusatz von festem NaCl.

Nach Zusatz des NaCl betrug die Endkonzentration in allen Ansätzen 4.12 Mol/l NaCl.

Kurve I: 5 /uMol/ml Mg^{++}, Kurve II: 5o/uMol/ml Mg^{++}

Bakterien: 6 Tage alt, E_{492} = o.o93, ATP: 5/uMol/Ansatz, pH: 6,9, TRIS: 6o mMol/l, pH: 7.4; Inkubation:

a) Präinkubation 1o' bei 25°C,

b) Inkubation 6o' bei 37°C; - Maximale Spaltung: 47.25%

E_{8oo} bei 37°C

Kurve I		Kurve II	
mit Kompl.	ohne Kompl.	mit Kompl.	ohne Kompl.
1) o.o92		o.o85	
2) o.17o	o.17o	o.135	o.125
3) o.33o		o.33o	
4) o.47o	o.455	o.44o	o.43o
5) o.5oo	o.52o	o.48o	o.46o
6) o.56o		o.54o	

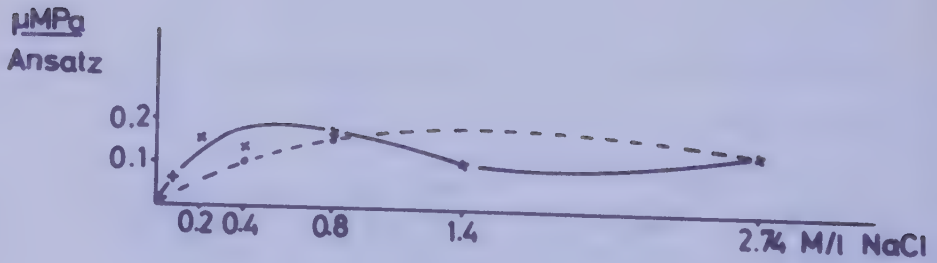
µMPa
Ansatz
0.2
0.1
0.2 0.4 0.8 1.4 2.74 M/l NaCl

Abb. 11: H. halobium

1. Verminderung der Fermentaktivität durch Dissoziation der Membranen bei fallenden NaCl-Konzentrationen
2. Reaktivierung des bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen präinkubierten Fermentes durch Zusatz von festem NaCl.

Nach Zusatz des NaCl betrug die Endkonzentration in allen Fällen 2.74 Mol/l. Ferment aus 5 Tage alten Bakterien; $E_{Carotin}$: o.15; ATP: 5 µMol/l/Ansatz; Mg^{++} 3 µMol/l. Zugabe vor der Präinkubation; TRIS: 8o mMol/l; pH 7.4; Präinkubation: 1o min bei 25°C; Test: 6o min bei 37°C; Maximale Spaltung: 2.5 % in 45 min. E_{8oo} m/u bei 37°C

mit Komplement		ohne Komplement	
1)	o.112		
2)	o.158		
3)	o.2oo	3b)	o.125
4)	o.345	4b)	o.26o
5)	o.52o	5b)	o.475
6)	o.57o		
7)	o.62o		

ZUM METHODISCHEN TEIL:

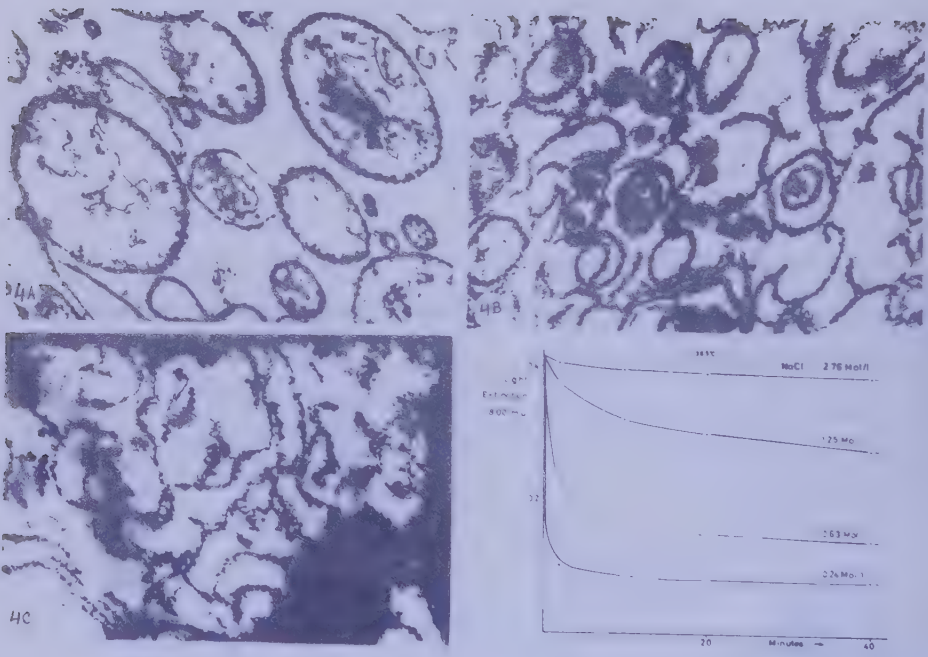

Abbildung I:
Lichtextinktion isolierter Membranen von Halobakterium Halobium nach Änderung des Suspensionsmediums auf die in der Abbildung angegebenen Kochsalzkonzentration. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen Zellmembranen bei 3 Kochsalzkonzentrationen 4A 2.76 Mol/l, 4B o.63 Mol/l, 4C o.24 Mol/l.

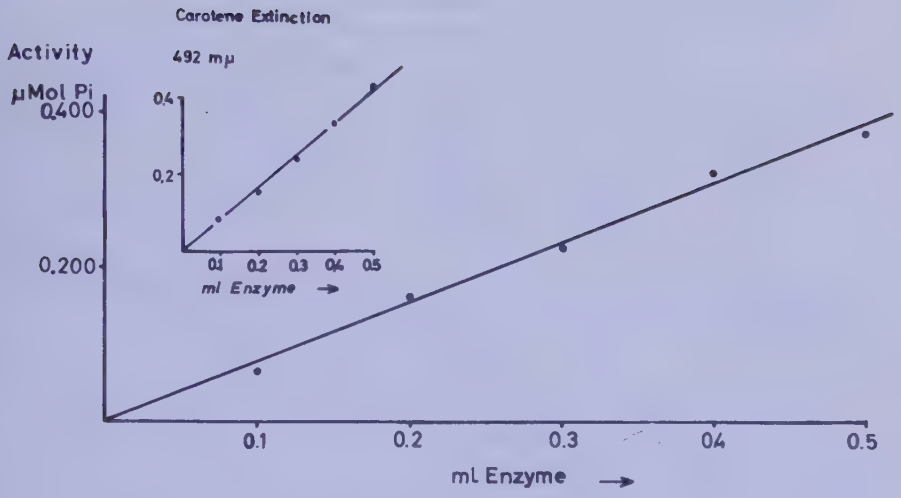

Abbildung II:
Die Abbildung zeigt die Proportionalität zwischen freigesetzter Phosphatmenge und Enzymkonzentration.

LITERATURVERZEICHNIS

1. BROWN, A.D. — The peripheral structures of gramnegative bacteria. IV The cation - sensitive dissolution of the cell - membrane of the halophilic bacterium, Halobacterium halobium Biochim. Biophys. Acta 75, 425 (1963)

2. CHRISTIAN, J.H.B. and WALTHO, J.A. — Solute concentrations within celle of halophilic and non halophilic bacteria Biochim. Biophys. Acta 65, 506-508 (1962)

3. DE, K., PASSOW, H. and WHITE — Some Properties of a Potassium-Sodium-Magnesium Activated Membrane Trinucleotidase of Halobacterium Halobium (A) Pflügers Archiv 289, 15 (1966)

4. BROWN, A.D. — Aspects of bacterial response to the ionic environment Bacteriological Reviews 296, 28 (1964)

5. MOHR and LARSEN — On the structural transformations and lysis of Halobacterium salinarium in hypotonic and isotonic solutions J. Gen. Mikrobiol. 31, (1963)

6. ABRAM and GIBBONS — Turbidity of suspensions and morphology of red halophilic bacteria as influenced by sodium chloride concentration Canad. J. Mikrobiol. 6, 535

7. KLEBAHN, H. — Die Schädlinge des Klippfisches Beihefte zum Jahrbuch der Hamburger wissenschaftlichen Anstalten 11-69, 36 Allgem. Botanik 4. Band

8. PETTER — On bacteria of salted fish Proc. Acad. Sci. Amst. (1932) Doctoral Thesis, University of Utrecht

9. LARSEN, H. — Halophilism. In I.C. Gunsalus and R.Y. Stanier. The bacteria 4. Academic Press, Ind., New York (1963)

1o. WEBER — Biol. Rev. City College New York 11, 9, (1949)

11. GOLIKOWA, S.M. — Eine Gruppe von obligat halophilen Bakterien, gezüchtet in Substanzen mit hohem NaCl-Gehalt Zentr. Bakteriol. Parasitenk. Abt. II, 8o, 35 (193o)

12. CHRISTIAN, J.H.B. — Doctoral thesis, University of Chambrigde, (1956)

13. FISKE, C.H. and SUBBAROW, Y. — J. Biol. Chem. 66, 375, (1925)

L E B E N S L A U F

1942 wurde ich in Saarburg als Tochter der Eheleute Franz GINSBACH und Gertrud geb. LELLIG geboren. Nach siebenjährigem Volksschulbesuch wurde ich 1955 im Staatlichen Neusprachlichen Realgymnasium in Saarburg eingeschult.

Im Januar 1964 verliess ich die Schule mit Abitur und grossem Latinum als Abschluss.

Vom April 1964 bis 18. Juni 1970 immatrikulierte ich mich an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes.

Das Vorphysikum legte ich im April 1965 ab, das Physikum im April 1967, das medizinische Staatsexamen vom Februar - Juni 1970 ab und bekam die Note - sehr gut-.

Homburg, den 10. Juli 1970

Gertrud Ginsbach

D A N K S A G U N G

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. H. Passow für die freundliche Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Ausführung der Arbeit im II. Physiologischen Institut.

Auch danke ich Herrn Prof. Dr. STOECKENIUS in San Francisco, der freundlicherweise die elektronenmikroskopischen Aufnahmen für uns gemacht hat.

Herrn Dr. rer. nat. SCHWEISSFURT, Hygienisches Institut Homburg, danke ich für die freundliche Beratung, was die Züchtung der Bakterien anbelangt.

I N H A L T S A N G A B E

		Seite
I.	Einleitung	1 - 8
II.	Material und Methoden	9 - 15
1)	Allgemeines über Halobakterien	9 - 12
2)	Züchtung der Bakterien	12
3)	Fermentpräparation	13 - 14
4)	Messung der Trinukleotidaseaktivität	14 - 15
III	Ergebnisse	16
1)	Mg^{++} als Aktivator	16
2)	Reaktivierung der Fermentaktivität dissoziierter Membranen	17
3)	Enzymaktivität als Funktion der Substratkonzentration	17 - 18
4)	Reaktivierung der Enzymaktivität dissoziierter Membranen durch NaCl	18 - 2o
IV	Diskussion	21 - 24
V	Abbildungen	25 - 44
VI	Literaturverzeichnis	45 - 46
VII	Lebenslauf	47
VIII	Danksagung	48